

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 99448

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

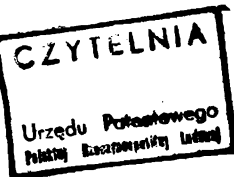
Zgłoszono: 22.09.76 (P. 192609)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 18.07.77

Opis patentowy opublikowano: 30.12.1978

Int. Cl². C12K 1/06



Twórcy wynalazku: Kazimierz Kornacki, Andrzej Fetliński, Zofia Rybicka,
Leszek Stepaniak

Uprawniony z patentu: Centralny Zarząd Przemysłu Mleczarskiego
Zakład Produkcji Biopreparatów Mleczarskich, Olsztyn (Polska)

Sposób otrzymywania koncentratu *Bacillus stearothermophilus* w formie suszonej

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania koncentratu bakterii *Bacillus stearothermophilus* w postaci liofilizowanej lub w proszku. Koncentrat sporów *Bacillus stearothermophilus* może być stosowany jako drobnoustrój testowy przy oznaczaniu antybiotyków metodami dyfuzyjnymi lub ze względu na dużą oporność termiczną może służyć do oznaczania skuteczności zabiegów sterylizacyjnych. Czułość bakterii *Bacillus stearothermophilus* na antybiotyki jest wysoka. Również wysokie tempo wzrostu form wegetatywnych i przetrwalnikowych predysponuje do stosowania jako bakterii testowej przy oznaczaniu antybiotyków. *Bacillus stearothermophilus* w temperaturze 55–65°C rośnie z szybkością wystarczającą do określania stref zahamowania wzrostu przy metodach dyfuzyjnych, już w czasie około 2 godzin. Przetrwalniki *Bacillus stearothermophilus* giną dopiero przy ogrzewaniu w temperaturze 120–122°C przez 15 minut, dzięki czemu mogą służyć do kontroli skuteczności sterylizacji.

Znane są sposoby otrzymywania przetrwalników *Bacillus stearothermophilus* poprzez zmyw z hodowli powierzchniowych. W tym celu agaryzowane podłoże, zawierające hydrolizat białkowy, autolizat drożdżowy i glukozę, zaszczepia się powierzchniowo w butlach Roux. Następnie butle inkubuje się w temperaturze 50–70°C w czasie od kilku do kilkunastu dni. Po zakończeniu hodowli wyrosnięte na powierzchni podłoża kolonie bakterii *Bacillus stearothermophilus* zmywa się wodą jałową, po czym zmyw ogrzewa się celem zniszczenia form wegetatywnych bakterii. Do zmywu dodaje się czynnika ochronnego i poddaje liofilizacji lub suszeniu. Z jednej butli Roux, zawierającej 1500 mililitrów podłoża, można uzyskać 10 mililitrów zmywu, zawierającego około 10⁸ przetrwalników w 1 mililitrze. Jest to metoda bardzo pracochłonna, czasochłonna i mało efektywna. Cykl każdy trwa od kilku do kilkunastu dni.

Celem wynalazku jest opracowanie metody, pozwalającej na zwiększenie efektywności hodowli *Bacillus stearothermophilus* i uzyskanie liofilizowanego lub suszonego rozpyłowo standardowego koncentratu przetrwalników.

Według wynalazku przetrwalniki *Bacillus stearothermophilus* otrzymuje się metodą hodowli wgłębnej na

podłożu płynnym. W tym celu zawiesiną bakterii, otrzymaną na podłożu agaryzowanym, zaszczepia się podłoże płynne, zawierające hydrolizat białkowy 0,1–3,0%, autolizat drożdżowy 0,05–2,0%, glukozę 0,05–1,0% i prowadzi hodowlę w temperaturze 50–70°C w stałym pH = 6,0–8,0 przy ciągłym napowietrzaniu jałowym powietrzem minimum w ilości 0,1 litra powietrza na 1 litr pożywki w ciągu jednej minuty. Czas hodowli trwa od 6–24 godzin. Hodowla kończy się w momencie ustalenia się gęstości optycznej na niezmiennym poziomie, co odpowiada około 1×10^{12} bakterii w 1 mililitrze hodowli. Po zakończeniu hodowli zagęszcza się zawartość komórek poprzez wirowanie i przetrzymuje w temperaturze 50–70°C przez 24–48 godzin celem zwiększenia liczby form przetrwalnikujących. Następnie inaktywuje się formy wegetatywne poprzez pasteryzację w temperaturze od 80–120°C w czasie od 2 sekund do 30 minut. Po czym liofilizuje lub suszy rozpyłowo z dodatkiem lub bez dodatku czynnika ochronnego w postaci np. cytrynianów, cukrów, itp. w ilości 1–40% w celu przedłużenia przeżywalności drobnoustrojów w procesie utrwalania. Uzyskany tą metodą suszony koncentrat sporów zawiera około 1×10^{10} żywych form przetrwalnikujących w 1 gramie. Trwałość koncentratu przechowywanego bez dostępu powietrza, jest praktycznie nieograniczona.

Sposób według wynalazku pozwala na skrócenie i zwiększenie wydajności procesu około 150 krotnie. Dotychczas znaną metodą z 1500 mililitrów podłoża uzyskuje się około 10 mililitrów zmywu, zawierającego około 10^8 przetrwalników, natomiast w proponowanym przez nas sposobie, tę samą ilość można otrzymać z 10 mililitrów podłoża. Ponadto metoda jest uproszczona i znacznie mniejsza jej pracochłonność.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest w przykładzie wykonania standardowego liofilizowanego koncentratu przetrwalników *Bacillus stearothermophilus* varietes *calidolactis*.

P r z y k ł a d. Hodowlę bakterii *Bacillus stearothermophilus* varietes *calidolactis* prowadzi się na wszystkich etapach technologicznych na pożywce płynnej lub z dodatkiem agaru o następującym składzie: hydrolizat białkowy 0,5%, autolizat drożdżowy 0,5%, glukoza 0,5%, agar 1,5%. Powyższe podłoże z dodatkiem agaru rozlewa się do probówek, zaszczepia czystą kulturą bakterii *Bacillus stearothermophilus* varietes *calidolactis* i inkubuje w temperaturze 62–65°C przez 24 godziny. Wyrosnięte na powierzchni podłoża kolonie zmywa się jałowym płynem fizjologicznym, dodając 5 mililitrów płynu na 1 skos podłoża.

Z otrzymanej zawiesiny przygotowuje się zaktywizowaną kulturę macierzystą. W tym celu przenosi się ją do 1 litra pożywki płynnej o składzie: hydrolizat białkowy 0,5%, autolizat drożdżowy 0,5% i glukoza 0,5%, i napowietrza w ilości 1 litra powietrza na 1 litr pożywki w czasie 1 minuty. Inkubację prowadzi się przez 8 godzin w temperaturze 62–65°C. Uzyskaną w ten sposób aktywną kulturę macierzystą zaszczepia się w ilości 3% jałową pożywkę płynną z dodatkiem mikroelementów: 20 mg $MnCl_2 \times 4H_2O$ i po 10 mg $MgCl_2 \times 6H_2O$ i $FeCl_2 \times 6H_2O$. Hodowlę bakterii prowadzi się w fermentorze produkcyjnym w temperaturze 53–55°C przy stałym pH=6,8 w czasie do 14 godzin przy ciągłym napowietrzaniu. Jałowe powietrze podaje się w ciągu minuty minimum w ilości odpowiadającej objętości pożywki w fermentorze. Wskaźnikiem zakończenia hodowli jest zmniejszenie tempa przyrostu gęstości optycznej i ustalenie się na jej poziomie, odpowiadającym zawartości bakterii w ilości około 10^9 w 1 mililitrze oraz osiągnięcie poziomu 50% przetrwalników w stosunku do liczby bakterii. Parametry te osiąga się w czasie do 20 godzin hodowli. Po zakończeniu hodowli zawiesinę komórek zagęszcza się 20-krotnie poprzez wirowanie, następnie rozcieńcza się objętościowo wodą sterylną w stosunku 1:1. Rozcieńczoną zawiesinę komórek inkubuje się w temperaturze 62–65°C w czasie 48 godzin w celu uzyskania zwiększonej ilości form przetrwalnikowych bakterii. Po upływie okresu inkubacji celem inaktywacji form wegetatywnych drobnoustrojów zawiesinę bakterii pasteryzuje się w temperaturze 95°C przez 15 minut. Następnie dodaje się 3% laktozy, która spełnia rolę czynnika ochronnego, liofilizuje lub suszy na wieży rozpyłowej.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania koncentratu *Bacillus stearothermophilus* w formie suszonej poprzez zmyw z hodowli powierzchniowych na podłożu agaryzowanym, inaktywację form wegetatywnych, dodatek czynnika ochronnego, liofilizację lub suszenie, z n a m i e n n y t y m, że zawiesinę bakterii *Bacillus stearothermophilus*, otrzymaną na podłożu agaryzowanym, zaszczepia się podłoże płynne, zawierające hydrolizat białkowy 0,1–3,0%, autolizat drożdżowy 0,05–2,0%, glukozę 0,05–1,0% i prowadzi hodowlę węgelną w temperaturze 50–70°C w stałym pH = 6,0–8,0 przyciągłym napowietrzaniu jałowym powietrzem minimum w ilości 0,1 litra powietrza na 1 litr pożywki w ciągu jednej minuty, w czasie od 6–24 godzin, następnie po zakończeniu hodowli zawiesinę komórek poddaje się wirowaniu, przetrzymuje w temperaturze 50–70°C przez 24–48 godzin, po czym inaktywuje formy wegetatywne, a następnie liofilizuje lub suszy rozpyłowo, ewentualnie z dodatkiem czynnika ochronnego.